

P21462.P03

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

Applicant : T. TAGAWA et al.

Appl No. : Not Yet Assigned

PCT Branch

I.A. Filed : March 15, 2001

PCT/JP00/01563

For : LIGAND-BONDED COMPLEX

CLAIM OF PRIORITY

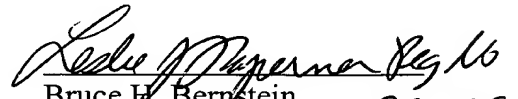
Commissioner of Patents and Trademarks

Washington, D.C. 20231

Sir:

Applicant hereby claims the right of priority granted pursuant to 35 U.S.C. 119 based upon Japanese Application No. 11-71690, filed March 17, 1999. The International Bureau already should have sent a certified copy of the Japanese application to the United States designated office. If the certified copy has not arrived, please contact the undersigned.

Respectfully submitted,
T. TAGAWA et al.


Bruce H. Bernstein
Reg. No. 29,027 33,329

September 13, 2001
GREENBLUM & BERNSTEIN, P.L.C.
1941 Roland Clarke Place
Reston, VA 20191
(703) 716-1191

THIS PAGE BLANK (USPTO)

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

09/926154 #5

PCT/JP00/01563

15.03.00 3/04/02

SF 1/01563

日 本 国 特 許 庁

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

REC'D 09 MAY 2000

WIPO

PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日

Date of Application:

1999年 3月17日

(4)

出 願 番 号

Application Number:

平成11年特許願第071690号

出 願 人

Applicant (s):

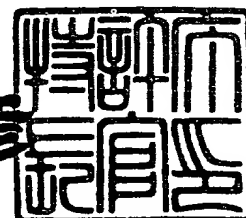
三菱化学株式会社

PRIORITY
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 4月21日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特2000-3027868

特平 11-071690

【書類名】 特許願

【整理番号】 99099M

【提出日】 平成11年 3月17日

【あて先】 特許庁長官 殿

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000番地 三菱化学
株式会社横浜総合研究所内

【氏名】 田川 俊明

【発明者】

【住所又は居所】 東京都町田市東玉川学園 1-12-28

【氏名】 鈴木 勉

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000番地 三菱化学
株式会社横浜総合研究所内

【氏名】 矢田 信久

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000番地 三菱化学
株式会社横浜総合研究所内

【氏名】 長池 一博

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000番地 三菱化学
株式会社横浜総合研究所内

【氏名】 平川 容子

【発明者】

【住所又は居所】 神奈川県横浜市青葉区鴨志田町 1000番地 三菱化学
株式会社横浜総合研究所内

【氏名】 細川 斉子

【特許出願人】

【識別番号】 000005968

【氏名又は名称】 三菱化学株式会社

【代理人】

【識別番号】 100096219

【弁理士】

【氏名又は名称】 今村 正純

【選任した代理人】

【識別番号】 100092635

【弁理士】

【氏名又は名称】 塩澤 寿夫

【選任した代理人】

【識別番号】 100095843

【弁理士】

【氏名又は名称】 釜田 淳爾

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 038357

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9805687

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 リガンド結合複合体

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 標的物に対してアフィニティーを有するリガンドを微粒子に対して直接又は間接的に 2 個以上結合させたリガンド結合複合体であって、該リガンドのアフィニティーが、遊離標的物の存在下において該リガンド結合複合体が非遊離標的物に対して実質的に特異的に結合することができるようなアフィニティーであることを特徴とする複合体。

【請求項 2】 実質的に同一のアフィニティーを有する 1 種類のリガンドを 1 個の微粒子に対して 2 個以上結合させた請求項 1 に記載のリガンド結合複合体。

【請求項 3】 上記リガンドを 2～50 個結合させた請求項 2 に記載のリガンド結合複合体。

【請求項 4】 リガンドが微粒子に対して直接結合した請求項 1 ないし 3 のいずれか 1 項に記載のリガンド結合複合体。

【請求項 5】 水溶性高分子が微粒子に結合した請求項 1 ないし 4 のいずれか 1 項に記載のリガンド結合複合体。

【請求項 6】 水溶性高分子がポリアルキレングリコールである請求項 5 に記載のリガンド結合複合体。

【請求項 7】 水溶性高分子がポリエチレングリコールである請求項 5 に記載のリガンド結合複合体。

【請求項 8】 リガンドの一部又は全部が微粒子に対して水溶性高分子を介して間接的に結合した請求項 5 ないし 7 のいずれか 1 項に記載のリガンド結合複合体。

【請求項 9】 微粒子が低分子薬剤、マーカー分子、タンパク質、ミセル、及びリポソームからなる群から選ばれる請求項 1 ないし 8 のいずれか 1 項に記載のリガンド結合複合体。

【請求項 10】 微粒子がリポソームである請求項 9 に記載のリガンド結合複合体。

【請求項 11】 リポソームが医薬の有効成分を封入したリポソームである請求

項 10 に記載のリガンド結合複合体。

【請求項 12】 医薬が抗腫瘍剤である請求項 11 に記載のリガンド結合複合体

。

【請求項 13】 抗腫瘍剤がアドリマイシンである請求項 12 に記載のリガンド結合複合体。

【請求項 14】 リガンドが抗体である請求項 1 ないし 13 のいずれか 1 項に記載のリガンド結合複合体。

【請求項 15】 抗体が抗腫瘍抗体である請求項 14 に記載のリガンド結合複合体。

【請求項 16】 抗体が水溶性高分子を介して抗腫瘍剤を封入したリポソームに結合した請求項 15 に記載のリガンド結合複合体。

【請求項 17】 標的物と 1 個のリガンドとの解離定数が $E-8M$ 以上である請求項 1 ないし 16 のいずれか 1 項に記載のリガンド結合複合体。

【請求項 18】 標的物と 1 個のリガンドとの解離定数が $E-7M$ 以上である請求項 1 ないし 16 のいずれか 1 項に記載のリガンド結合複合体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、リガンド結合複合体に関するものである。より具体的には、本発明は、遊離抗原などの遊離標的物とは実質的に結合せず、癌細胞等の標的物に対して特異的に反応しうるリガンド結合複合体及びその製造方法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

抗体等の反応特異性のあるリガンドを用いて細胞特異的、部位特異的に薬物を誘導する試みが広く行われている。癌細胞に対するターゲティング療法はこの一例である。すでに、抗体と毒素や放射性化合物との複合体やイムノリポソーム等の医薬がすでに開発されており、また抗体と放射性化合物との複合体を用いた癌等の体内診断も行われている。このような抗体結合複合体を用いたターゲティング療法は、標的物に対するリガンド（抗体など）の高い特異性に基づいており、優

れた治療効果と副作用の低減が期待できる。

【0003】

一方、ターゲティング療法では、血中等に存在する遊離抗原などの遊離標的物に対して抗体結合複合体が反応してしまい、原発巣や転移巣などの非遊離抗原などをゆるする固形腫瘍組織に対して十分量の薬物が反応できないという問題点が指摘されている。つまり、ある種の癌で見られるように、抗原の一部が血中に分泌したり、あるいは癌細胞から抗原が逸脱することによって遊離の抗原（可溶性抗原）が血中に出現すると、その遊離抗原に対して抗体結合複合体が反応して免疫複合体が形成され、標的細胞への反応が阻害されてしまうことが問題である。このため、抗体結合複合体をデザインする場合には、血中の遊離抗原がないか、または遊離抗原が極めて少ない抗体を選択する必要があった。さらに、臨床で血清診断による意義が認められている抗原に対する抗体を抗体結合複合体の製造に用いることは困難であった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題及び課題を解決するための手段】

本発明の課題は、遊離抗原などの遊離標的物とは実質的に結合せず、癌細胞等の非遊離の標的物に対して特異的に反応しうるリガンド結合複合体を提供することにある。本発明者らは上記の課題を解決すべく、遊離抗原のような可溶性標的物と抗体などのリガンドとの関係を研究した結果、驚くべきことに、標的物に対するアフィニティーの低いリガンドを複数個結合させたリガンド結合複合体が、遊離標的物の存在下においても癌細胞などの非遊離の標的物に対して高い反応性を有することを見いだした。本発明は上記の知見を基にして完成されたものである。

【0005】

すなわち、本発明は、標的物に対してアフィニティーを有するリガンドを微粒子に対して直接又は間接的に2個以上結合させたリガンド結合複合体であって、該リガンドのアフィニティーが、遊離標的物の存在下において該リガンド結合複合体が非遊離標的物に対して実質的に特異的に結合することができるようなアフィニティーであることを特徴とする複合体を提供するものである。

【0006】

本発明の好ましい態様によれば、実質的に同一のアフィニティーを有する1種類のリガンドを1個の微粒子に対して2個以上結合させた上記リガンド結合複合体；実質的に同一のアフィニティーを有する1種類のリガンドを1個の微粒子に対して2～50個結合させた上記リガンド結合複合体が提供される。また、リガンドが微粒子に対して直接結合した上記リガンド結合複合体；水溶性高分子、好ましくはポリアルキレングリコール、さらに好ましくはポリエチレングリコールが微粒子に結合した上記リガンド結合複合体；リガンドの一部又は全部が微粒子に対して間接的に結合した上記リガンド結合複合体、好ましくはリガンドの一部又は全部が微粒子に対して水溶性高分子を介して間接的に結合した上記リガンド結合複合体が提供される。

【0007】

さらに好ましい態様によれば、微粒子が低分子薬剤、マーカー分子、タンパク質、ミセル、及びリポソームからなる群から選ばれる上記リガンド結合複合体；微粒子がリポソーム、好ましくは医薬化合物を封入したリポソーム、さらに好ましくはアドリアマイシンなどの抗腫瘍剤を封入したリポソームである上記リガンド結合複合体；リガンドが抗体、好ましくは抗腫瘍抗体、より好ましくはヒト癌細胞反応性ヒトモノクローナル抗体、特に好ましくはヒト癌細胞反応性ヒトモノクローナル抗体1-3-1である上記リガンド結合複合体が提供される。

【0008】

本発明の特に好ましい態様のリガンド結合複合体では、微粒子がアドリアマイシンを封入したリポソームであり、リポソームの表面にポリエチレングリコールが結合されており、かつ該ポリエチレングリコールの一部に上記アフィニティーを有する抗腫瘍抗体、好ましくはヒト癌細胞反応性ヒトモノクローナル抗体1-3-1が結合している。該抗腫瘍抗体はリポソーム1個あたり2～50個、好ましくは10～30個程度結合していてもよく、ポリエチレングリコールの先端部分に結合していることが好ましい。

【0009】

【発明の実施の形態】

リガンドとしては、標的物に対してアフィニティーを有するものであれば、その種類は特に限定されないが、例えば、トランスフェリン、CEA、EGF、AFP等の蛋白質；インシュリン等のペプチド；モノクローナル抗体等の抗体；腫瘍抗原などの抗原；ホルモン；伝達物質；ルイスX、ガングリオシド等の糖質；葉酸やその誘導体のような低分子化合物を用いることができる。上記に例示したリガンドはその全体を用いてもよいが、酵素処理等によって得られるそのフラグメントを用いてもよい。また、人工的に合成されたペプチドやペプチド誘導体であってもよい。抗体を治療用に用いる場合は、マウスーヒトのキメラ抗体、ヒト化抗体、又はヒト抗体などが好ましい。リガンドとしては抗体が好ましく、抗腫瘍抗体がより好ましい。特に好ましいのは、ヒト癌細胞反応性ヒトモノクローナル抗体 1-3-1 である。

【0010】

本明細書において、「標的物」とは、リガンドが特異的に結合できる物質を意味しており、その種類は特に限定されず、低分子物質又は高分子物質のいずれでもよい。標的物としては、例えば、抗原、抗体、レセプター、増殖因子などを挙げることができる。本明細書において「非遊離標的物」という場合には、リガンドが結合する標的物を有する細胞や組織などを包含する概念として用いる。リガンドと標的物とは、通常は別の分子を意味しているが、同一分子同士で結合する性質を有する高分子物質、例えば胎児性癌抗原である CEA（CEA 同士での弱い相互作用により細胞接着に寄与していると考えられている）をリガンド及び標的物として用いてもよい。標的物としては、腫瘍抗原が好ましく、特に好ましいのはヒト癌細胞反応性ヒトモノクローナル抗体 1-3-1 により認識可能な腫瘍抗原である。

【0011】

本明細書において、「遊離標的物」とは、一般的には腫瘍細胞や腫瘍組織などの固形状態で存在している非遊離の標的物から血液中又はリンパ液中などに放出される低分子化合物、ポリペプチド、又は蛋白質などの物質であって、リガンドが非遊離の標的物と実質的に等価に認識可能なものを意味している。典型的な遊離標的物は、腫瘍細胞から血中に放出される可溶性抗原である。遊離標的物は、非

遊離の標的物に存在する細胞表面抗原と同一物質であってもよく、同一エピトープを有する類似の分子種であってもよい。

【0012】

本発明のリガンド結合複合体に用いられるリガンドは、遊離標的物の存在下において、リガンド結合複合体が非遊離標的物に対して実質的に特異的に結合することができるような標的物に対するアフィニティーを有している必要がある。リガンドが上記のアフィニティーを有するか否かは、リガンド結合複合体を製造した後、本明細書の実施例に具体的に説明した方法に従って、遊離標的物の存在下で非遊離標的物に対する結合能を調べることにより、容易に判定することが可能である。

【0013】

リガンドのアフィニティーの程度をコントロールするためには、リガンドを化学修飾して構造の一部を改変してもよく、抗体、蛋白質、ペプチドなどの場合にはアミノ酸変異を遺伝子工学的に導入してもよい。単鎖抗体のようにな改変体を用いることもできる。例えば、リガンドと標的物との解離定数が $E-8$ (M) 程度より大きいもの、好ましくは $E-7$ (M) 程度より大きいものが好適である。

【0014】

微粒子に2個以上のリガンドを結合する方法として、リガンド同士を架橋させる方法を採用してもよい。架橋は架橋試薬を用いた一般的な方法により達成できる。例えば、グルタルアルデヒド法、過ヨウ素酸法、マレイミド法、又はピリジル・ジスルフィド法などの架橋方法を採用することができる（酵素免疫測定法、石川栄治ら、医学書院）。架橋した抗体などのリガンドに対して、毒素、蛋白質、薬剤、放射性元素等を結合することもできる。例えば、クロラミンT法を用いて放射性ヨウ素を抗体に導入することができる。また、アミノベンジル-EDTAやイソチオシアノベンジル-EDTA等の2価性キレート試薬を用いて ^{111}In 等を導入することもできる（核医学、31、473（1994））。

【0015】

リポソームの表面に水溶性高分子を結合することにより、リポソームの特性を改変できることが知られている。このような水溶性高分子を本発明のリガンド結合

複合体の微粒子表面に結合することができる。水溶性高分子は、所望の特性に応じて適宜の水溶性高分子を選択することができるが、例えば、ポリアルキレングリコール、ポリアクリルアミド、ポリビニルピロリドン、ポリグリセリン、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、ポリアミノ酸等の合成高分子などを用いることができる。また、ポリアミノ酸、ポリオキシ酸等の生分解性ポリマーも好適に使用される。水溶性高分子の分子量は約500～20,000が好ましく、1,500～10,000がより好ましく、さらに好ましくは2,000から6,000である。

【0016】

水溶性高分子として、好ましくはポリアルキレングリコール、より好ましくはポリエチレングリコールを用いることができる。水溶性高分子を微粒子表面に結合する場合には、水溶性高分子の一部又は全部に対してリガンドの一部又は全部を結合させることができる。例えば、微粒子表面に結合されたポリアルキレングリコールのうちの一部にリガンドの全てを結合させる態様は、本発明の好ましい態様である。この場合、ポリアルキレングリコールの先端にリガンドを結合させることがより好ましい。また、例えば、ポリリジン、ポリアスパラギン酸等のポリアミノ酸にアミド結合を介してリガンドを導入することが可能である。そのリガンドに対して、さらに放射性同位体、毒素蛋白質、薬剤等を導入してもよい。

【0017】

本発明のリガンド結合複合体を構成する微粒子としては、例えば、分子中に親水性部分及び疎水性部分を含む両親媒性分子の凝集によって得られるミセル、高分子ミセル、マイクロスフェア、エマルジョン、リボソーム、リボソームなどの二分子膜小胞体を重合して得られる高分子ベシクル、カリオニックリボソーム、遺伝子複合体などを用いることができる。微粒子は両親媒性物質から構成される小球、楕円体、又は長い円筒形の形態を取りうるが、例えば、細胞、ウイルス等の天然小胞、天然小胞を放射線照射や高分子で修飾した改変天然小胞、リボソーム、novasome、非界面活性剤ベシクルなどであってもよい。微粒子の粒径は、例えば20～500nm程度である。

【0018】

微粒子として、好適にはリボソームを用いることができる。リボソームの種類は

特に限定されず、マルチラメラリポソーム (MLV)、スモールユニラメラリポソーム (SUV)、ラージユニラメラリポソーム (LUV) のいずれでもよいが、好ましくは LUV を用いることができる。

【0019】

微粒子を構成する両親媒性分子としては、親水性部分及び疎水性部分を含み、微粒子を形成できるものであればその種類は限定されない。例えば、好適な両親媒性物質としては脂質を挙げることができる。脂質としては、例えば、天然フォスファチジルコリン、例えば卵黄フォスファチジルコリン (EYPC) 等；フォスファチジルコリン (PC)、例えばジパルミトイルフォスファチジルコリン (DPPC)、ジミリストイルフォスファチジルコリン (DMPC)、ジステアロイルフォスファチジルコリン (DSPC)、ジオレオイルフォスファチジルコリン (DOPC) 等；天然フォスファチジルエタノールアミン、例えば卵黄フォスファチジルエタノールアミン (EYPC)；フォスファチジルエタノールアミン (PE)、例えばジパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン (DPPE)、ジオレオイルフォスファチジルエタノールアミン (DOPE)、ジミリストイルフォスファチジルエタノールアミン (DMPPE) 等；フォスファチジルグリセロール (PG)、例えばジパルミトイルフォスファチジルグリセロール (DPPE) 等；フォスファチジルセリン (PS)；フォスファチジルイノシトール (PI)；フォスファチジン酸 (PA)、例えばジパルミトイルフォスファチジン酸 (DPPE) 等のリン脂質、スフィンゴ糖脂質、グリセロ糖脂質等を挙げることができる。これらの脂質は単独または2種以上、あるいはこれらとコレステロール等の非極性物質とを組み合わせてもよい。

【0020】

さらに、ステアリルアミン、ジセチルフォスフェート、DC-Chol (3β -[N-(N',N'-dimethyl(aminoethyl)carbamoyl)cholesterol] 等のコレステロール誘導体などの荷電性物質、マレイミド基を有するリン脂質誘導体 (特開平 6-157559 号公報) や PEG 先端にマレイミド基を有するリン脂質誘導体 (特開平 6-220070 号公報) 等を含んでいてもよい。また、融合リポソームとして知られるリポソームとセンダイウイルスを融合したリポソームのように、ウイル

スの一部又は全部を組み込んだものであってもよい。

【0021】

ミセル又はリポソームなどの微粒子の製造方法は特に限定されず、当業者に利用可能な方法はいずれも採用することができる。例えば、ガラス壁に付着させた脂質薄膜に水溶液を加え機械的震とうを加えMLVを製造する方法；超音波処理、エタノール注入法、フレンチプレス法によりSUVを製造する方法；界面活性剤除去法、逆相蒸発法（リポソーム、砂本ら、南江堂、1988）、MLVを均一ポア径を有するメンブランを加圧して押し出すエクストルージョン法等によりLUVを製造する方法などを利用することができる（Liposome Technology, Vol. 1, 2nd editon）。

【0022】

微粒子内に封入する医薬の種類は特に限定されず、治療、予防、又は診断に用いられる医薬の有効成分を微粒子内に封入することができる。例えば、アドリアマイシン（ドキソルピシン：DXR）、ダウノマイシン、ビンブラスチン、シスプラチン、マイトマイシン、ブレオオマイシン、5-FU等の抗腫瘍剤；チモロール等のアドレナリン遮断薬；クロニジン等の高血圧剤；プロカインアミド等の制吐剤；クロロキニーネ等の抗マラリア剤；アンフォテンシン等の抗生物質；リシンA鎖やジフテリアトキシン等の毒素蛋白質及びそれをコードする遺伝子；k-ras等のアンチセンス遺伝子、TNFやP53等をコードする遺伝子、これらの遺伝子とポリリジン等のポリカチオンとの複合体；ヨード、レニウム、インジウム、テクネシウム、イットリウム等の放射性同位元素；ガドリニウム等のMRI造影剤；ヨウ素化合物などのX線造影剤；CO₂等の超音波造影剤；ユーロピウム、カルボキシフルオレッセイン等の蛍光体；N-メチルアクリジウム誘導体等の発光体；ホースファディッシュペルオキシダーゼ、アルカリフォスファターゼ等の酵素などを挙げることができる。

【0023】

これらの医薬の微粒子内への封入方法は特に限定されず、当業者に利用可能なものであればいかなる方法を採用してもよい。例えば、微粒子としてリポソームを用いる場合には、リポソーム形成時に有効成分の水溶液を添加して封入すること

ができ、またリポソーム形成後にベシクル内外に pH 勾配等の濃度勾配を形成させ、このポテンシャルを駆動力としてイオン化可能な薬剤を取り込ませる方法（Cancer Res. 49, 5922(1989); BBA, 455, 269(1976)）を用いても良い。

【0024】

リガンドを微粒子に結合する手段は特に限定されず、共有結合、イオン結合などのいかなる手段で結合してもよい。例えば、微粒子としてリポソームを用いる場合は、リポソームにリガンドと反応しうるマレイミド基やカルボキシル基等の反応基を導入し、リポソーム形成後にリガンドを結合することができる（特開平 6 - 1 5 7 5 5 9 号公報、特開平 6 - 2 2 0 0 7 0 号公報、Advanced Drug Delivery Reviews, 24, 235(1997)）。より具体的には、マレイミドカプロイルジパルミチルフォスファチジルエタノールアミン（特開平 4 - 3 4 6 9 1 8 号公報）やマレイミドフェニルブチロイルフォスファチジルエタノールアミンなどのマレイミド基部分を有する脂質をフォスファチジルコリンやコレステロールとともに公知の方法に従ってリポソーム化することにより、マレイミド基部分を有するリポソームを製造することができる（リポソーム、2 章、野島ら編、南江堂（1988））。

【0025】

また、リガンドに脂質等の疎水性化合物を導入しておき、界面活性剤除去法でリポソーム形成時にリガンドをリポソームに導入することができる（BBA, 1070, 246(1991)）。リガンドは微粒子に直接結合していてもよいが、上記のように、水溶性高分子をスペーサーとして間接的に微粒子に結合していてもよい。スペーサーとして利用可能な水溶性高分子として、例えば、特願平 1 0 - 2 6 3 2 6 2 号明細書に開示された水溶性高分子誘導体を用いることができる。リガンドを微粒子に結合した後、さらに必要に応じて微粒子の表面を水溶性高分子で修飾することも可能である。

【0026】

本発明のリガンド結合複合体は、微粒子内部に封入された医薬の種類に応じて、目的とする疾患の治療、予防、又は診断に用いることができる。投与方法、投与量は封入された医薬の種類、微粒子の性質、及び投与目的に応じて適宜選択する

ことができるが、一般的には、血管内投与、膀胱内投与、腹腔内投与、局所投与法などの投与経路で用いることが望ましい。

【0027】

本発明のリガンド結合複合体の特に好ましい態様では、微粒子としてアドリマイシンを封入したリポソームを用い、リポソームの表面にポリエチレングリコールが結合されている。そのうちの一部のポリエチレングリコールには、先端部に抗腫瘍抗体が結合されており、リポソーム1個あたり2～50個、好ましくは10～30個程度結合の抗体が結合されている。この抗体は、上記複合体が血中に存在する遊離の腫瘍抗原に対しては実質的に反応せず、腫瘍抗原を有する非遊離の標的物（腫瘍細胞や腫瘍組織）に対して特異的に反応するようなアフィニティーを有している。

【0028】

上記の好ましい態様のリガンド結合複合体は、腫瘍のターゲッティング療法に有用であり、血管内投与、膀胱内投与、腹腔内投与、又は局所投与により用いることができる。投与量は、アドリマイシンとして10mg/kg以下、好ましくは5mg/kg、より好ましくは1mg/kg以下である。対象となる腫瘍は特に限定されないが、固形腫瘍、好ましくは胃癌、大腸癌、食道癌、口腔癌、肝臓癌、腎臓癌、乳癌、卵巣癌、子宮癌、前立腺癌、肺癌、脳腫瘍などの固形癌などのうち、腫瘍抗原を利用可能な癌種を対象とすることが好ましい。腫瘍抗原を特異的に認識するモノクローナル抗体の製造方法は当業者に周知であり、本明細書において規定したアフィニティーを有するモノクローナル抗体を適宜選択することが可能である。

【0029】

【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明の範囲は以下の実施例に限定されることはない。

実施例1

ヒト癌細胞反応性ヒトモノクローナル抗体1-3-1 (IgG) の $F(ab')_2$ フラグメント（分子量：100KDa）を用い抗体結合リポソームを作製した。

本抗体はヒトエノラーゼ (α 及び γ) 及びヒト胃癌細胞 MKN 45 に反応性を有する。本抗体を FITC ラベルし、パラホルムアルデヒドで固定した MKN 45 に対する解離定数をフローサイトメーター (FACSvantage ベクトン デッキンソン社) を用い測定したところ 1×10^{-7} (M) であった。解離定数は、反応における結合反応及び解離反応を以下のように速度論的に解析して求めた。

【0030】

結合反応；

パラホルムアルデヒドで固定した MKN 45 細胞を $500 \mu\text{L}$ の 1% BSA 溶液に懸濁し、終濃度が $1 \sim 10 \mu\text{g/mL}$ になるように FITC 標識抗体を正確にとりチューブにセットした。液温を 25°C にした後、サンプルポートに備わっている Vortex を用いて抗体と細胞を瞬時に混合すると同時に細胞を流して計測をスタートした。フローサイトメーターは細胞に結合した蛍光のみを検出することができるので、フリーの抗体存在下でも細胞に結合した抗体によるシフト量のみを測定できる。測定開始後、5 s から 10 s 間隔で抗体結合によるシフト量を測定し、既知の蛍光強度を持つ蛍光ラテックスビーズ (オーソダイアノスティック システムズ) を用いた検量線から蛍光量値に変換した。蛍光量値はさらに抗体一分子に導入された蛍光分子数で除することで細胞に結合した抗体量に変換した。これにより各抗体初期濃度 C 条件で、測定時間 t のときの細胞に結合した抗体量 F_t (すなわち抗原抗体コンプレックス量) が測定された。

【0031】

抗体の抗原への結合反応速度定数 k_{ass} は以下にして算出される。結合反応速度は抗原と抗体の濃度に比例し、結合反応速度定数 k_{ass} を用いて $k_{\text{ass}} \cdot C \cdot (F_{\text{max}} - F_t)$ と現される。また、解離反応速度は同様に解離反応速度定数 (k_{diss}) を用いて $k_{\text{diss}} \cdot F_t$ と現さる。抗原抗体コンプレックスに対して過剰量の初期抗体濃度を用いると、速度式、 $dF_t/dt = k_{\text{ass}} \cdot C \cdot (F_{\text{max}} - F_t) - k_{\text{diss}} \cdot F_t$ が導かれる。さらに変形すれば $dF_t/dt = k_{\text{ass}} \cdot C \cdot F_{\text{max}} - (k_{\text{ass}} \cdot C + k_{\text{diss}}) \cdot F_t$ になる。各抗体濃度について時間 (t) に対する F_t をプロットした曲線を回帰し、各時間に対する F 値と導関数 dF/dt をプロットすると一次関数になり、直線の傾きが $-(k_{\text{ass}} \cdot C + k_{\text{diss}})$ になるので、各濃度 C における傾きを算出した。 C と $-(k_{\text{ass}} \cdot C + k_{\text{diss}})$ の関係も一次式であり

、プロットしてその直線の傾きから k_{ass} を算出した。

【0032】

解離反応；

細胞を各濃度の蛍光標識抗体と反応させた後、遠心分離により細胞を洗浄しフリーの抗体を除去した。遠心してペレットダウンした細胞にあらかじめ 25°C に保温した $500\mu\text{L}$ の 1% BSA溶液を加えて懸濁した後、すばやくフローサイトメータにより細胞に結合している蛍光量を測定した。上述のように各抗体濃度の各時間点での結合抗体量 F_t を測定し、以下の方法で解離速度常数 k_{diss} を算出した。抗体濃度 C は 0 であるから、前述の式は $dF_t/dt = -k_{diss} \cdot F_t$ となる。この微分方程式を解く際に、決まった時間 t_1 から任意の時間 t_n までの定積分を行うことで、 $\ln(F_{t1}/F_{tn}) = k_{diss} \cdot (t_n - t_1)$ が得られる。したがって、 $t_n - t_1$ と $\ln(F_{t1}/F_{tn})$ をプロットすることで、傾きから k_{diss} が得られた。以上の結果から解離定数 K_d は $K_d = k_{diss}/k_{ass}$ で算出した。

【0033】

1-3-1 抗体の多量化抗体

50mM リン酸緩衝液、 1mM EDTA ($\text{pH} 7.0$) に溶解した上記 $F(a b')_2$ 抗体 ($1.3\text{mg}/\text{ml}$, 1.5ml) に、脱水メタノールに溶解した S -アセチルチオグリコール酸 N -ヒドロキシスクシンイミドエステル (シグマ社) (以下「SATA」と略することがある) ($5\text{mg}/\text{ml}$) を $18\mu\text{L}$ 添加し 25°C で 1 時間反応した。PD-10 (ファルマシア社) で緩衝液を 50mM リン酸緩衝液、 1mM EDTA ($\text{pH} 7.0$) に交換した後、抗体溶液の $1/9$ 容量の 0.5M ヒドロキシルアミン溶液 [0.5M ヒドロキシルアミン, 0.5M HEPES, 25mM EDTA ($\text{pH} 7.0$)] を添加した。 25°C で 10 分間反応し脱アセチルした後、 0.1M リン酸緩衝液- 1mM EDTA ($\text{pH} 6.0$) で平衡化したPD-10で脱塩し、緩衝液交換してチオール基を導入した抗体を得た。

【0034】

50mM リン酸緩衝液、 1mM EDTA ($\text{pH} 7.0$) に溶解した上記 $F(a b')_2$ 抗体 ($1.3\text{mg}/\text{ml}$, 1.5ml) に、脱水メタノールに溶解した N - $(\epsilon$

マレイミドカプロイルオキシ) スクシンイミド (同仁化学) (5 mg/mL) を 18 μ L 添加し 25℃ で 1 時間反応した。PD-10 で緩衝液を 50 mM リン酸緩衝液、1 mM EDTA (pH 7.0) に交換したしマレイミド基を導入した 1-3-1 抗体を作製した。上記チオール基を導入した抗体とマレイミド基を導入した抗体を等量混合し 25℃ で 2 時間反応することで多量体化した 1-3-1 抗体 (poly 1-3-1) を得た。この抗体の反応性を以下のエンザイムイムノアッセイ (EIA) 法で確認した。

【0035】

非遊離抗原への反応

α エノラーゼを 50 μ g/mL の濃度で 50 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.6) に溶解し、96 well プレートに加えて 37℃ で 2 時間反応することで固定化した。0.5%ゼラチンでブロッキング後、1-3-1 抗体、poly 1-3-1 抗体の希釈倍率を変えてプレートに添加した。37℃ で 1 時間反応し、PBST (0.05% Tween 20 含有 PBS) でプレートを洗浄後、2 次抗体として抗ヒト IgG-HRP (免疫動物山羊、カペル社) を各 well に加えて 37℃ で 1 時間反応した。PBST で洗浄後、OPD を基質としてプレートに固定化された α エノラーゼに反応した抗体を検出した。なお、1-3-1 抗体と poly 1-3-1 抗体とでは、本 2 次抗体の反応性に違いはなかった。その結果、図 1-a に示すように poly 1-3-1 抗体で高い反応性が示された。

【0036】

遊離抗原への反応

poly 1-3-1 抗体及び 1-3-1 抗体の希釈濃度を変え、50 mM 炭酸緩衝液 (pH 9.6) に溶解して 96 well プレートに加え、37℃ 2 時間反応することで固定化した。0.5%ゼラチンでブロッキングした後、20 μ g/mL の α エノラーゼを添加した。プレートを洗浄後、抗エノラーゼ抗体 (抗NSE 抗体、Biomeda 社、ウサギポリクロナール抗体) を 2 次抗体として用い、さらに抗ウサギ IgG-HRP 抗体を 3 次抗体として用いて、同様に OPD で発色した。その結果、固定化した両抗体を用いた EIA では、溶液として添加したエノラーゼへの反応はほとんど認められなかった (図 1-b)。

【0037】

これらの結果は、固定化した α エノラーゼに対しては、1-3-1抗体に比べてpoly 1-3-1抗体のほうがはるかに高い反応性を有していること、並びに遊離抗原に対しては、1-3-1抗体及びpoly 1-3-1抗体のいずれも実質的に反応性を有していないことを示している。従って、リガンド結合複合体の製造にあたり、リガンドとして1-3-1抗体のようなアフィニティーを有する抗体を微粒子に対して複数個結合させることにより、固定化抗原に対する反応性を高めるとともに、遊離抗原に対する反応性を低減できることが示唆された。なお、215M抗体/抗ウサギIgG-HRP抗体の組み合わせで α エノラーゼが検出可能であることは、上述のように直接エノラーゼをプレートに固定化して確認した(図1-b)。

【0038】

上記の試験に用いた α エノラーゼは、ヒト胃癌細胞株MKN45の培養上清から精製した。MKN45を血清無添加で培養し、その培養上清140mLを限外濾過(PM-10 アミコン社)で濃縮し、0.1M酢酸緩衝液(pH5.0)に置換した。陽イオン交換クロマトMono-S(ファルマシア社)に負荷し同酢酸緩衝液でNaCl濃度0M~0.5Mのリニアグラジエントを行い溶出した。1-3-1抗体に反応性のピークを集めて濃縮した後、YMC-PAC C4-APカラムにロードした。水(0.1% TFA含有)~アセトニトリル(0.08% TFA含有)のリニアグラジエントで展開し、1-3-1抗体に反応性の主ピークを分取した。本ピークはSDS-PAGEで単一バンドであり、ペプチドマップ、シーケンス解析の結果 α エノラーゼであることを確認した。

【0039】

実施例2: イムノリポソームの製造

「抗体へのチオール基の導入」

50mMリン酸緩衝液、1mMEDTA(pH7.0)に溶解した上記F(ab')₂抗体(1.4mg/mL)に、脱水したメタノールに溶解したS-A-T-Aをモル比6.4倍添加して25℃で1時間反応した。0.1M酢酸を添加しpHを4に調整した後、0.1M酢酸緩衝液pH4で平衡化したSP-セファロース(ファ

ルマシア社) にロードした。同緩衝液で洗浄した後、吸着した抗体を 50 mM リン酸緩衝液、1 mM EDTA (pH 7.5) で溶出した。セントリコン 30 (ミリポア社) で緩衝液を 50 mM リン酸緩衝液、1 mM EDTA (pH 7.0) に交換した後、抗体溶液の 1/9 容量の 0.5 M ヒドロキシルアミン溶液 (0.5 M ヒドロキシルアミン, 0.5 M HEPES, 25 mM EDTA (pH 7.0)) を添加した。25℃ で 10 分間反応して脱アセチルした後、0.1 M リン酸緩衝液-1 mM EDTA (pH 6.0) で平衡化した NAP-10 (ファルマシア社) で脱塩、緩衝液交換しチオール基を導入した抗体を得た。導入されたチオール基を 4,4'-ジチオピリジン (シグマ社) を用いて定量した (続生化学実験講座 5, p 109, 日本化学会編)。生じる 4-ピリドンの分子吸光係数を 22,500、抗体 1% 溶液の 280 nm における吸収を 1.4 として計算したところ $F(ab')_2$ あたりに導入されたチオール基は 1.4 であった。

【0040】

「リポソームの作製」

均一に混合した DPPC、コレステロール、 ϵ -マレイミドカプロイルパルミトイルフォスファチジルエタノールアミン (MC-DPPE) (モル比: 18/10/0.5) からなる脂質 400 mg に 10 mM カルボキシフルオレッセイン (CF) 水溶液を 4 ml 添加し、ボルテックスミキサーを用いて 60℃ で混合し水和した。さらに 3 回凍結融解を繰り返して CF 封入マルチラメラリポソーム (MLV) を作製した。これを 0.2 μ m 及び 0.1 μ m のニユクレオポアメンブレンを装着したエクストルウダーに順次通すことで整粒し、CF 封入リポソームを得た。

【0041】

「抗体の結合」

上記リポソームを 0.1 M リン酸緩衝液 1 mM EDTA (pH 6.0) で希釈し、脂質濃度として 43 mg/mL とした。このリポソーム溶液に脂質重量比 8% の上記チオール化抗体を加え 25℃ で 1 時間反応させた後、さらに 10℃ で一夜反応した。この反応物を生理食塩水で平衡化したセファロース CL6B で精製し、目的とする 1-3-1 抗体結合イムノリポソームを得た。得られたイムノリ

ポソームの脂質濃度をリン脂質Cテストワコー（和光純薬社）で測定した。抗体量はSDSで可溶化後、BCAキット（ピアス社）を用いて定量した。その結果、抗体結合量は脂質の5重量%であった。

【0042】

「細胞への結合実験」

ヒト胃癌細胞株MKN45をヌードマウス皮下に移植し十分大きくなった時点で切除した。腫瘍組織を細切後、メッシュで濾過して癌細胞を取り、パラフォルムアルデヒドで固定した。1-3-1抗体結合イムノリポソーム及び各濃度のヒトニューロンスペシフィックエノラーゼ（ γ エノラーゼ Advanced ImmunoChemical社）をヒト血清中で混合し（イムノリポソーム脂質濃度 $100\mu\text{g/mL}$ ）、 37°C で30分プレインキュベートした。ペレットダウンした上記癌細胞（E6個）に本溶液を添加し、サスペンドして 37°C で1時間反応した。癌細胞を1%BSA含有PBSで洗浄後、細胞に結合したイムノリポソームの蛍光をフローサイトメーターで定量した。その結果、図2に示すように遊離抗原（可溶性抗原）の濃度を増加しても、細胞に対しての反応性はほとんど低下しなかった。

【0043】

比較例1

市販の抗ヒトVCAM-1マウスモノクローナル抗体BBIG-V1（IgG、R&D systems社）を用いる以外は実施例2と同様にしてCF封入抗VCAM-1イムノリポソームを作製した。なお本抗体の解離定数は $E-9\text{M}$ であり、抗体結合量は脂質の1重量%であった。CF封入抗VCAM-1イムノリポソームのターゲット細胞としてヒトVCAM-1を導入した下記CHO細胞を、遊離抗原としてヒトVCAM-Igを用いること以外は実施例2と同様にして、遊離抗原のイムノリポソームの反応に及ぼす影響を調べた。その結果、図2に示すように遊離抗原濃度に依存してイムノリポソームの反応性は急速に低下した。この比較例におけるターゲット細胞と遊離抗原は、以下のようにして調製した。

【0044】

「ターゲット細胞」

ヒトVCAM-1 cDNA（R&Dsystem社）を発現ベクターpME18sに

サブクローニングし、耐性マーカー pSV2neo と共に CHO にリポフェクションを用いてコトランスフェクトすることにより G418 耐性株をクローニングしてターゲット細胞とした。VCAM-1 の CHO 細胞膜上での発現はフローサイトメトリーで確認した。

「遊離抗原」

ヒト VCAM-1 cDNA (R&D system 社) の細胞外領域 (1~698 アミノ酸) とヒト IgG1 H 鎖の CH2~CH3 領域とを PCR 法を用いて連結して cDNA (VCAM-1 Ig) を得た。この cDNA を上述の方法で CHO に導入し、VCAM-1 Ig 分泌 CHO 細胞を作製して、細胞培養液から分離精製した分泌型 ICAM-1 を遊離抗原として使用した。

【0045】

実施例 3

癌マーカーである CEA は同時に接着因子としても作用し、CEA 同士の弱い結合相互作用が知られている。CEA を結合したリポソームに対する遊離抗原の影響を調べた。リポソームへの結合時の CEA の量を脂質比 1% とすること以外は実施例 2 と同様にして、CEA を結合した CF 封入リポソームを作製した。リポソームに結合した CEA は脂質比 0.2% であった。さらに、実施例 2 と同様にして、癌細胞への反応性をヒト胃癌細胞 MKN45 及びフリーの CEA を用いて調べた。その結果、図 2 に示すようにフリー CEA の存在下においても癌細胞に対する反応性はほとんど低下しなかった。

【0046】

実施例 4 : DXR 封入 1-3-1 抗体結合イムノリポソームの製造

塩化メチレン 10 mL に溶解したポリ (エチレングリコール) -ビス- ω -アミノ- α -カルボキシル (PEG 平均分子量 3,400、Shearwater polymers, Inc) 1 g に S-アセチルチオグリコール酸 N-ヒドロキシスクシンイミドエステル (Sigma) 74.8 mg 及びトリエチルアミン 41 μ l を添加した。攪拌し溶解後、さらに 10 mg の S-アセチルチオグリコール酸 N-ヒドロキシスクシンイミドを添加し室温で 3.5 時間攪拌し反応した。反応進行は TLC (クロロホルム/メタノール = 85/10、ヨウ素発色、以下

TLCは同様の条件で行った)で添加したポリ(エチレングリコール)-ビス- ω -アミノ- α -カルボキシルの低Rfのスポットが高Rf(約0.6)にシフトすることで確認した。

【0047】

窒素下に溶媒を留去した反応物にクロロホルム10mLを添加し溶解した。クロロホルムで膨潤したsep-pak(SILICA PLUS、Waters社)に添加しクロロホルム/メタノール(4/1(v/v))で溶出することでサンプルを前処理した。再び窒素下に溶媒を留去しクロロホルムに溶解後、シリカゲルカラム(ローバーカラム、LiChroprep Si60、25×310cm、関東化学)に添加した。クロロホルムで洗浄後、クロロホルム/メタノール(85/15(V/V))で展開溶離しTLCのRfが約0.6の主生成物をブールし精製した。窒素下に溶媒を留去し583mgを得た。543mgを約2mLの脱水した塩化メチレンに溶解しジエチルエーテルを加え沈殿化し濾取し真空ポンプで減圧乾燥した。脱水した塩化メチレン5mLに溶解したのち、N-ヒドロキシスクシンイミド(Sigma)17.8mgを加え10分間攪拌した。さらにN,N'-ジシクロヘキシルカルボジイミド31.9mgを添加し窒素雰囲気下、攪拌しつつ室温で一夜反応した。沈殿物を濾別後、窒素下に溶媒を留去し少量の脱水塩化メチレンに溶解した。エチルエーテルを加え析出した沈殿を濾取し真空ポンプで減圧乾燥しTLCで単一な目的物337mg(Ac-S-PEG-Suc:特願平10-263262号明細書の実施例1に記載の化合物)を取得した。¹H-NMRにより目的物生成を確認した。

【0048】

50mMリン酸緩衝液、1mM EDTA(pH7.0)に溶解した1-3-1抗体(F(ab')₂)(4.2mg/mL)に脱水メタノールに溶解したAc-S-PEG-Suc(60mg/mL)を添加した。抗体に対し8倍モルのAc-S-PEG-Sucを加えて25℃で1時間反応した。本PEG誘導体を導入した1-3-1抗体を実施例2と同様にしてSP-セファロースで精製し、ヒドロキシルアミンで脱保護して、PEGスペーサーを介してチオール基を有する抗体を調整した。PD-10で脱塩して、緩衝液を0.1Mリン酸緩衝液、1mME

DTA (pH 6. 0) とした。チオール基の導入量を同様に測定したところ 1. 3 SH/抗体であった。

【0049】

CF 溶液に換えて 0. 3 M クエン酸緩衝液 pH 4. 0 を用いること以外は実施例 2 と同様にして、0. 1 μ m に整粒したリポソームを作製した。得られたリポソームを 1 M 水酸化ナトリウムで中和後、60℃ に加温しつつ脂質重量の 1/10 のアドリアマイシン（協和発酵）を添加しすることでほぼ定量的にアドリアマイシンを封入した。このアドリアマイシン封入リポソームに脂質の 8 重量% の上記チオール化抗体を添加して 25℃ で 1 時間反応した。さらにチオール化ポリエチレングリコール（特開平 4 - 3 4 6 9 1 8 号公報）を反応させ、抗体及びポリエチレングリコールを結合したイムノリポソームを作製した。さらに対照としてチオール化抗体を結合させる以外は上記と同様にして、抗体非結合 PEG 結合リポソームを作製した。

【0050】

1 - 3 - 1 抗体はヒト大腸癌細胞株 DLD - 1 に対して反応性を有している。そこで、得られたアドリアマイシンを封入した抗体結合及び抗体非結合リポソームの癌細胞に対する *in vitro* 抗腫瘍効果を比較するために DLD - 1 株を用いた。DLD - 1 をヌードマウスの背部皮下に移植して形成した腫瘍から得られた細胞をマイクロチューブに分注し、抗体結合及び非結合リポソームを添加して 37℃ で 1 時間反応した。リポソーム液を除去後、96 穴プレートに播種して培養し、リポソーム無添加の細胞がほぼコンフルエントになった時点で MTT アッセイにより細胞数を計測した。その結果、図 3 に示すように、抗体非結合リポソームに比べて抗体結合リポソームは高い増殖抑制効果を示した。

【0051】

【発明の効果】

本発明のリガンド結合複合体は、遊離抗原などの遊離標的物とは実質的に結合せず、癌細胞等の標的物に対して特異的に反応することができるので、例えば、腫瘍のターゲッティング療法を効率的に行うことができる。

【図面の簡単な説明】

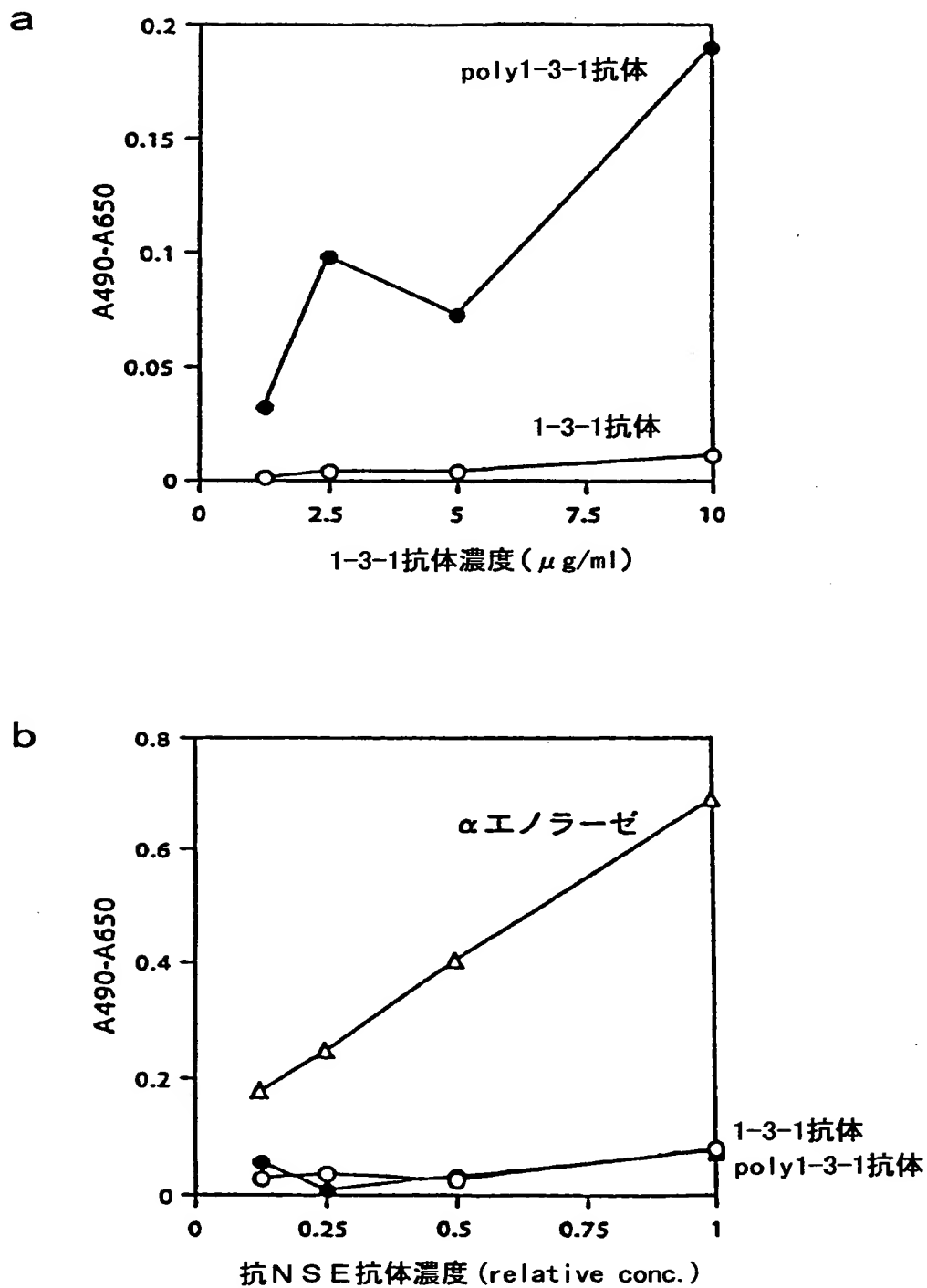
【図 1】 1-3-1 抗体及び poly 1-3-1 抗体を用いたエンザイムイムノアッセイの結果を示す。図中、横軸は抗体濃度、縦軸は O P D を基質として用いた吸光度を示し、1-a は抗原を固定化した場合の結果を示し、1-b は抗体を固定化した場合の結果を示す。

【図 2】 蛍光色素を封入した各種リガンド結合リポソームを遊離抗原の存在下で標的細胞に反応させた結果を示した図である。図中、横軸は反応液中の可溶性抗原（遊離抗原）濃度を示し、縦軸はリポソームの細胞への結合量を示す。可溶性抗原が共存しないときの細胞へのリポソームの結合量を 100 として示した。

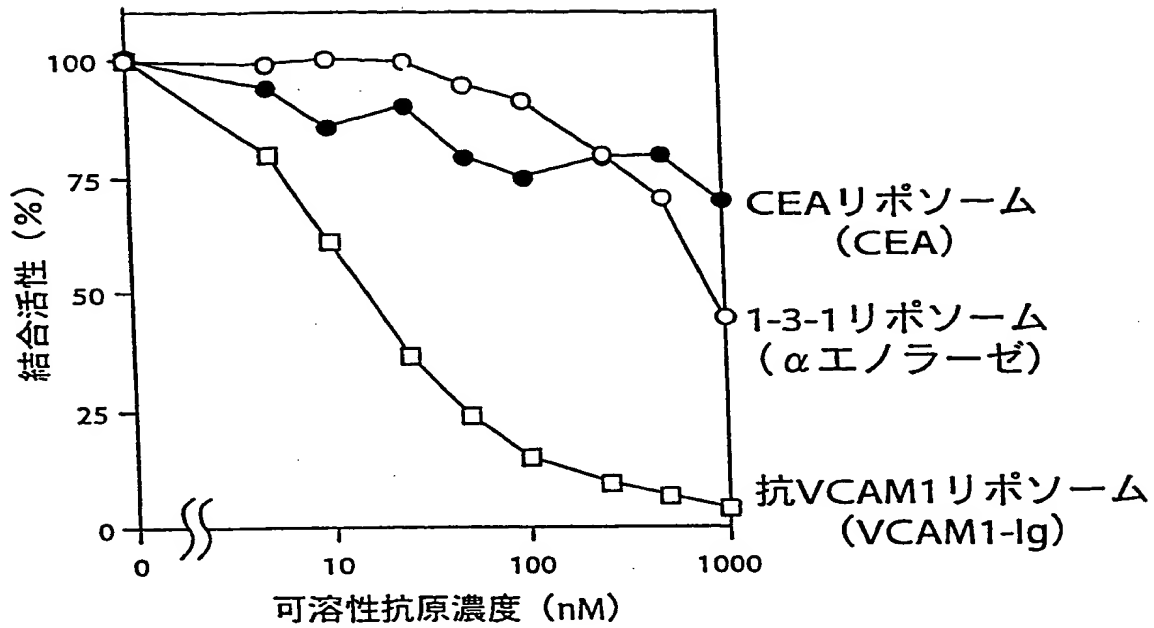
【図 3】 アドリアマイシン（DXR）を封入した 1-3-1 抗体結合イムノリポソームのヒト大腸癌細胞株 D L D-1 に対するインビトロ抗腫瘍効果を示した図である。図中、横軸はリポソーム量を DXR 量として示してあり、縦軸はリポソーム非添加時の細胞数を 100 とした各リポソーム濃度での細胞数の割合を示す。

【書類名】 図面

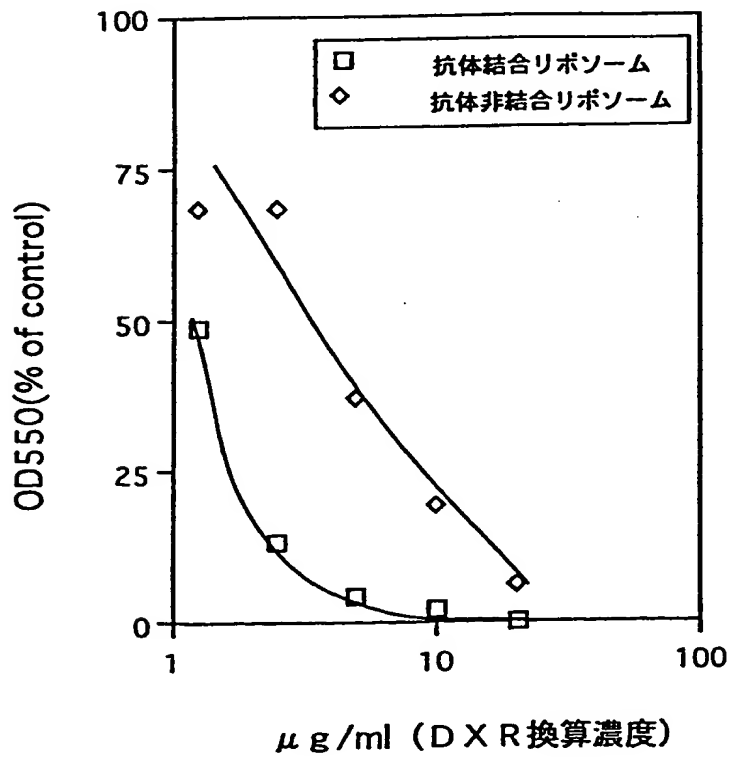
【図 1】



【図2】



【図3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 可溶性腫瘍抗原などの遊離標的物には反応せず、腫瘍細胞や該細胞に存在する腫瘍抗原などの非遊離標的物に対して実質的に特異的に反応できるリガンド結合複合体を提供する。

【解決手段】 腫瘍抗原などの標的物に対してアフィニティーを有する抗体などのリガンドを微粒子（抗腫瘍剤などを封入したリポソームなど）に対して2個以上、好ましくは10～30個程度結合させたリガンド結合複合体であって、該リガンドのアフィニティーが、遊離標的物の存在下において該リガンド結合複合体が非遊離標的物に対して実質的に特異的に結合することができるようなアフィニティーであることを特徴とする複合体。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [000005968]

1. 変更年月日	1994年10月20日
[変更理由]	名称変更
住 所	東京都千代田区丸の内二丁目5番2号
氏 名	三菱化学株式会社